



#2

0590

06/14/01
0288

**PIPER MARBURY
RUDNICK & WOLFE^{LLP}**
1200 NINETEENTH STREET, NW
WASHINGTON, DC 20036-2412
TELEPHONE: 202-861-3900
FACSIMILE: 202-223-2085

DOCKET NO.: 9558-003-27

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS
WASHINGTON, D.C. 20231

Re: Serial No.: 09/865,579
Applicant(s): Toshiki TAYA et al.
Filing Date: May 29, 2001
For: OLIGONUCLEOTIDES AND METHOD FOR DETECTION OF MECA
GENE OF METHICILLIN-RESISTANT STAPHYLOCOCCUS
AUREUS
Group Art Unit: Unassigned
Examiner: Unassigned

SIR:


Attached hereto for filing are the following papers:

REQUEST FOR PRIORITY
CERTIFIED COPY OF JAPANESE PATENT APPLICATION 2000-163149
CERTIFIED COPY OF JAPANESE PATENT APPLICATION 2000-179394

Our check in the amount of \$ 0 is attached covering any required fees. In the event any variance exists between the amount enclosed and the Patent Office charges for filing the above-noted documents, including any fees required under 37 C.F.R. 1.136 for any necessary extension of time to make the filing of the attached documents timely, please charge or credit the difference to Deposit Account No. 50-1442. Further, if these papers are not considered timely filed, then a request is hereby made under 37 C.F.R. 1.136 for the necessary extension of time. A duplicate copy of this sheet is enclosed.

Respectfully submitted,

PIPER MARBURY RUDNICK & WOLFE LLP



Steven B. Kelber
Attorney of Record
Registration No.: 30,073

DOCKET NO.: 9558-003#27



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Toshiki TAYA et al.

ART UNIT: Unassigned

EXAMINER: Unassigned

SERIAL NO: 09/865,579

FILED: May 29, 2001

FOR: OLIGONUCLEOTIDES AND METHOD FOR DETECTION OF MECA GENE OF METHICILLIN-RESISTANT STAPHYLOCOCCUS AUREUS

REQUEST FOR PRIORITY

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS
WASHINGTON, D.C. 20231

SIR:

- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number [US App No], filed [US App Dt], is claimed pursuant to the provisions of **35 U.S.C. §120**.
- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number , filed , is claimed pursuant to the provisions of **35 U.S.C. §119(e)**.
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of **35 U.S.C. §119**, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
JAPAN	2000-163149	MAY 29, 2000
JAPAN	2000-179394	JUNE 9, 2000

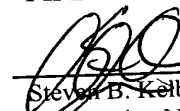
Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
(B) Application Serial No.(s)
- ☐ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully submitted,

PIPER MARBURY RUDNICK & WOLFE LLP

1200 Nineteenth Street, N.W.
Washington, D.C. 20036-2412
Telephone No. (202) 861-3900
Facsimile No. (202) 223-2085


Steven B. Keiber
Registration No.: 30,073



本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年 5月29日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-163149

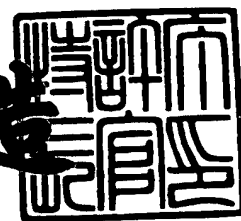
出 願 人
Applicant(s):

東ソー株式会社

2001年 5月30日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3047330

【書類名】 特許願

【整理番号】 PA211-0187

【提出日】 平成12年 5月29日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明の名称】 メシチリン耐性黄色ブドウ球菌検出のためのオリゴヌクレオチド

【請求項の数】 4

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県相模原市上鶴間 1 7 1 8 - 1 2

 【氏名】 田谷 敏貴

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県横浜市港北区岸根町 4 9 0 - 1 7

 【氏名】 石黒 敬彦

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県大和市桜森 2 - 2 0 - 1 6 - 1 0 1

 【氏名】 斉藤 寿一

【特許出願人】

 【識別番号】 000003300

 【氏名又は名称】 東ソー株式会社

 【代表者】 田代 圓

 【電話番号】 (03)-3505-4471

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 003610

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

特 2 0 0 0 - 1 6 3 1 4 9

【プルーフの要否】 要

【書類名】明細書

【発明の名称】メシチリン耐性黄色ブドウ球菌検出のためのオリゴヌクレオチド

【特許請求の範囲】

【請求項1】メシチリン耐性黄色ブドウ球菌 (*Methicillin-Resistant Staphyrococcus Aureus*、以下MRSAとする) の遺伝子要素である *mecA* 遺伝子又は該遺伝子に由来するRNAを、切断、検出又は増幅するために有用なオリゴヌクレオチドであって、*mecA* 遺伝子又は該遺伝子に由来するRNAと特異的に結合可能である、配列番号1から17に示したいずれかの配列中の少なくとも連続した10塩基以上からなるオリゴヌクレオチド又はそれらのオリゴヌクレオチドと相補的であるオリゴヌクレオチド。

【請求項2】前記オリゴヌクレオチドは、DNA伸長反応のためのオリゴヌクレオチドプライマーである、請求項1のオリゴヌクレオチド。

【請求項3】前記オリゴヌクレオチドは、その一部が修飾され又は検出可能な標識物質により標識されたオリゴヌクレオチドプローブである、請求項1のオリゴヌクレオチド。

【請求項4】前記オリゴヌクレオチドは、その塩基の一部がオリゴヌクレオチドプローブとしての機能を損なわない範囲で変換された合成オリゴヌクレオチドである、請求項3のオリゴヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、臨床検査におけるMRSA検出用のオリゴヌクレオチドに関するものである。本発明で提供されるオリゴヌクレオチドは、RNAやDNAの切断、増幅そして検出といった操作を行う遺伝子診断用の試薬として、また、RNAの逆転写や翻訳を阻害するための薬剤として有用である。特に、本発明で提供されるオリゴヌクレオチドの配列は、MRSAの定量や診断用の試薬等に有用である。

【0002】

【従来の技術】

MRSAは、院内感染の主要な病原菌であり、メシチリンをはじめとするβ-ラクタム系の抗菌薬全般に耐性を示す。また近年では、治療薬の切り札的存在とみなされているバンコマイシンに軽度耐性を示す菌株も検出されている。このように、MRSAは決定的な抗菌薬がないために大きな医療問題となっている。従って、臨床検査における正確・迅速な検出は、診断と治療における重大な課題である。

【0003】

通常、黄色ブドウ球菌が産生する細胞壁合成タンパク質PBP (penicillin-Binding Protein) はPBP-1からPBP-4の4種類存在するが、MRSAではPBP-2' と名付けられた新たなPBPも産生される。このPBPはβ-ラクタム系の抗生物質への結合親和力の弱い特異的なタンパク質であり、耐性の中心的な役割を果たすことが知られている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

PBP-2' をコードする遺伝子mecAの配列は既に知られている(FEB S Lett. 221, 167?171, 1987年、他)。そこで、MRSAの検出及び同定には、mecA遺伝子に特異的な遺伝子プローブを用いるハイブリダイゼーション法が試みられているが、試料の調製に患者検体から採取した菌の培養が必要なため、迅速性に課題があった。

【0005】

このように、MRSAの検出及び同定には、培養に長時間を要し、また短時間で試料中に存在する極微量のmecA遺伝子を検出することは困難であったため、臨床診断の分野では迅速かつ高感度な検出法の出現が望まれている。さらには、検査をより簡便にするために、自動検査装置の開発も望まれている。

【0006】

検出を高感度で行うためには、検出及び同定しようとする遺伝子や該遺伝子に由来するRNA (以下これらを標的核酸とする) 中の特定の配列を増幅したうえ

で検出等することが好適である。

【0007】

標的核酸がDNAである場合の増幅法としては、ポリメラーゼチェーンリアクション（PCR）法が知られている。この方法は、標的DNA中の特定の配列の両末端部に相補的及び相同な一組のプライマーと熱耐性DNAポリメラーゼ存在下で、熱変性、プライマー・アニール、伸長反応からなるサイクルを繰り返し行うことによって前記特定の配列を増幅する方法である。この時、前記特定の配列をPCR法で増幅するには前記特定の配列との特異性が高いオリゴヌクレオチドが必要であり、更にその検出及び同定を高感度で行うためには、標的DNAとの特異性が高いオリゴヌクレオチドが必要である。そこで、特定の配列のオリゴヌクレオチドを用いて、mecA遺伝子をPCR法で黄色ブドウ球菌の染色体DNA上で検出する試みがなされている。しかしながら、試料の調製に患者検体から採取した菌の培養が必要なため、前記のハイブリダイゼーション法と同様、迅速性に課題があった。また、染色体DNA上のmecA遺伝子を検出したとしても、実際にPBP-2'の発現を同定したことにはならないために、臨床的意義上の問題点も挙げられる。また、PCR法は急激な昇温・降温を繰り返すという複雑操作が必要であり、そのことが自動化への障害となる。

【0008】

一方、標的核酸がRNAである場合の増幅法としては、RT-PCR法その他、逆転写酵素及びRNAポリメラーゼの協奏的作用によって前記特定配列を増幅するNASBA法や3SR法等が知られている。この方法は、標的RNA中の特定の配列に対し、プロモーター配列を含むプライマーと逆転写酵素、及びリボヌクレオースHにより、プロモーター配列を含む2本鎖DNAを合成し、該2本鎖DNAを鋳型としてRNAポリメラーゼにより、前記特定塩基配列を含むRNAを合成するとともに、該RNAが引き続きプロモーター配列を含む2本鎖DNA合成の鋳型となる連鎖反応を行うものである。NASBA法や3SR法は一定温度での核酸増幅が可能であり、自動化へ適している方法と考えられる。この場合、PBP-2'をコードするmRNAを定性又は定量等することにより、mecA遺伝子の存在、更にはその存在量を測定することが可能である。しかも、mRN

Aは発現するPBP-2'の被翻訳遺伝子であるため、染色体DNA上のmecA遺伝子のコピー数と比較して遙かに多量存在する。従って、検体から菌の培養を経ることなくmecA遺伝子を検出することができ、迅速診断として有用である。この時、前記特定の配列をNASBA法などで増幅するには前記特定の配列との特異性が高いオリゴヌクレオチドが必要であり、更にその検出及び同定を高感度で行うためには、標的RNAとの特異性が高いオリゴヌクレオチドが必要である。そこで、特定の配列のオリゴヌクレオチドを用いて、mecA遺伝子をNASBA法で黄色ブドウ球菌の染色体DNA上に検出する試みが知られている。しかし、NASBA法などは比較的低温（例えば41℃）で増幅反応を行うために、標的RNAが分子内構造を形成し、プライマーの結合を阻害し、反応効率を低下させる可能性が考えられる。従って、増幅反応の前に標的RNAの熱変性を行うことで、標的RNAの分子内構造を壊し、プライマーの結合効率を向上させるための操作が必要であった。また、更には、低温でRNAの検出等を行う場合にも、前記のような分子内構造を形成したRNAに対して結合し得るオリゴヌクレオチドが必要であった。

【0009】

そこで本願発明は、MRSAが産生する細胞壁合成タンパク質PBP-2'をコードするmecA遺伝子又はこれら遺伝子に由来するRNAを特異的に切断したり、増幅したり、これらの検出及び同定を高感度で行うために有用なオリゴヌクレオチドの提供を目的とするものである。また、RNAの逆転写や翻訳を阻害するための薬剤として有用なオリゴヌクレオチドの配列を提供することにある。

【0010】

【課題を解決するための手段】

前記目的を達成するためになされた本願請求項1の発明は、MRSAの遺伝子要素であるmecA遺伝子（細胞壁合成タンパク質PBP-2'をコードする）又は該遺伝子に由来するRNAを、切断、検出又は増幅するために有用なオリゴヌクレオチドであって、mecA遺伝子又は該遺伝子に由来するRNAと特異的に結合可能である、配列番号1から17に示したいずれかの配列中の少なくとも連続した10塩基以上からなるオリゴヌクレオチド又はそれらのオリゴヌクレオ

チドと相補的であるオリゴヌクレオチドである。

【 0 0 1 1 】

本願請求項 2 の発明は、前記請求項 1 の発明に係り、前記オリゴヌクレオチドが DNA 伸長反応のためのオリゴヌクレオチドプライマーであることを特徴とする。本願請求項 3 の発明は、前記請求項 1 の発明に係り、前記オリゴヌクレオチドの一部が修飾され又は検出可能な標識物質により標識されたオリゴヌクレオチドプローブであることを特徴とする。そして本願請求項 4 の発明は、請求項 3 の発明に係り、前記オリゴヌクレオチドの塩基の一部がオリゴヌクレオチドプローブとしての機能を損なわない範囲で変換された合成オリゴヌクレオチドであることを特徴とする。以下、本願発明を詳細に説明する。

【 0 0 1 2 】

本願発明のオリゴヌクレオチドは、前記した RNA の増幅に際して、標的 RNA の分子内構造フリーな領域に対して特異的に相補結合を形成するオリゴヌクレオチドであり、前記したような熱変性を行うことなしに標的 RNA と特異的に結合可能である。このように本願発明は、比較的低温かつ一定温度（35℃～50℃、好ましくは 41℃）で、PBP-2' をコードする mecA 遺伝子に由来する RNA の分子内構造フリー領域に対して結合するオリゴヌクレオチドであり、mecA 遺伝子の特異的に切断、増幅、又は検出等するために有用なオリゴヌクレオチドである。より具体的には、本願発明は PCR 法によって前記標的 DNA を増幅するためのオリゴヌクレオチドプライマー、NASBA 法等によって前記標的 RNA を増幅するためのオリゴヌクレオチドプライマー、そしてかかる増幅なしに、或いはかかる増幅の後に標的核酸を検出等するためのオリゴヌクレオチドプローブとして利用することで、迅速かつ高感度な検出を達成するためのオリゴヌクレオチドである。なお、最近、遺伝子検出技術向上のために、アデニン・グアニン・シトシン・チミン（又はウラシル）塩基塩基による相補的配列の認識というオリゴヌクレオチドプローブとしての機能を損なわない、新しい化学合成物質の開発が進められている。一例として、核酸 DNA の骨格構造である糖およびリン酸の骨格をポリアミド骨格に置き換えた Peptide Nucleic Acid (PNA) を挙げることができる。従って本発明の検出プローブとし

ては、PNAのように塩基配列認識の機能を損なわない範囲で変換されたものも含まれる。

【0013】

配列番号1から17は、mecA遺伝子に由来するRNAを切断、増幅又は検出等するために有用な本願発明のオリゴヌクレオチドの一例を示すものである。ここで、mecA遺伝子に由来するRNAとは、これら遺伝子を鋳型として製造されるRNAをも含む。本願発明のオリゴヌクレオチドは、配列番号1から17としてそれぞれ記載した全塩基配列を含むものであっても良いが、mecA遺伝子等との特異的な結合には10塩基程度あれば十分であることから、それぞれ記載した塩基配列のうち少なくとも連続した10塩基以上からなるオリゴヌクレオチドであれば良く、また更にはこれらの相補的なオリゴヌクレオチドであっても良い。

【0014】

本願発明のオリゴヌクレオチドは、例えば核酸増幅用のオリゴヌクレオチドプライマーとして使用できる。本願発明のオリゴヌクレオチドをプライマーとして核酸増幅法を実施すれば、標的核酸、即ちmecAのみを増幅可能である。増幅方法としてはPCR法、LCR法、NASBA法、3SR法等が例示できるが、中でもLCR法、NASBA法、3SR法等の一定温度で実施できる核酸増幅法が好ましい。この増幅産物を種々の方法により検出等することで、MRSAの検出が可能となる。この場合、増幅で使用したオリゴヌクレオチド以外の上記オリゴヌクレオチドをプローブとして使用しても良いし、増幅された特定配列の断片を電気泳動等により確認しても良い。

【0015】

本願発明のオリゴヌクレオチドは、例えばその一部を修飾し又は検出可能な標識物質により標識することにより、プローブとして使用することができる。標的核酸を検出しようとする場合、検出可能な標識物質により標識された本願発明のオリゴヌクレオチドを一本鎖の標的核酸とハイブリダイズさせ、ハイブリダイズしたプローブについて前記標識を検出等すれば良い。標識の検出等は、標識物質に適した方法を採用すれば良く、例えば、オリゴヌクレオチドの標識にインター

カレーター性蛍光色素を用いた場合は、標的核酸とオリゴヌクレオチドプローブからなる二本鎖核酸にインターカレーションすることで蛍光強度が増加する性質の色素等を用いれば、標的核酸とハイブリダイズしていないプローブを除去等することなく、ハイブリダイズしたプローブのみを検出することが容易に実施できる。通常の蛍光色素等を標識として使用した場合には、標的核酸とハイブリダイズしていないプローブを除去等した後に検出すれば良い。なお、検出に当たっては、試料中の標的核酸をPCR法、NASBA法、3SR法などといった種々の核酸増幅法により検出可能な量まで増幅させることが望ましく、中でもNASBA法、3SR法等の一定温度核酸増幅法が最も望ましい。ここで、上記オリゴヌクレオチドを標識したプローブを増幅の際に反応液の中に共存させる場合は、プローブがヌクレオチドプライマーとして機能しないように、例えばその3'末端にグリコール酸を付加する等の修飾を行うことが特に望ましい。

【0016】

【発明の実施の形態】

以下、本願発明を実施例により更に詳細に説明するが、本発明はこれら実施例により限定されるものではない。

【0017】

実施例 1

mecA-RNAに対して、本願発明のオリゴヌクレオチドが41℃で特異的に結合するかを確認した。なお、*mecA*-RNAは、*mecA*の塩基配列を含む二本鎖DNAを鋳型としたインビトロ転写により合成、精製されたRNAである。

【0018】

まず、PBP-2' に由来する*mecA*-RNAの塩基番号1~2013 (RNAの塩基番号は松橋ら、FEBS Lett. 221, 167から171頁に従った) を含む標準RNA (2016mer) を試料とし、260nmの紫外部吸収により定量後、RNA希釈液 (10mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.1mM EDTA、0.5U/ μ l RNase Inhibitor) を用い 2.0×10^{-12} mol/ μ lとなるよう希釈した。

【0019】

次に、市販の0.5ml容PCR用チューブ（商品名；Gene Amp Thin-Walled Reaction Tubes、パーキンエルマー（株）製）に以下の各試薬を分注した。

【0020】

- 0.90 μ l 1M Tris-塩酸緩衝液 (pH8.6)
- 0.20 μ l 1M 塩化マグネシウム
- 0.67 μ l 2M 塩化カリウム
- 0.15 μ l 0.1M DTT
- 0.33 μ l 119 U/ μ l RNase インヒビター
- 9.95 μ l 蒸留水
- 0.6 μ l 2 pmol/ μ l mecA-RNA 試料
- 1.2 μ l 1.0 μ M オリゴヌクレオチド溶液

なお、オリゴヌクレオチド溶液としては、以下の番号のオリゴヌクレオチド溶液のうち、いずれか一つを用いた。

【0021】

1. mecA-RNAの塩基番号241から261に相補的なオリゴヌクレオチド（配列番号1）
2. mecA-RNAの塩基番号264から283に相補的なオリゴヌクレオチド（配列番号2）
3. mecA-RNAの塩基番号296から315に相補的なオリゴヌクレオチド（配列番号3）
4. mecA-RNAの塩基番号349から368に相補的なオリゴヌクレオチド（配列番号4）
5. mecA-RNAの塩基番号402から421に相補的なオリゴヌクレオチド
6. mecA-RNAの塩基番号425から444に相補的なオリゴヌクレオチド
7. mecA-RNAの塩基番号456から475に相補的なオリゴヌクレオチド

チド (配列番号5)

8. *mecA*-RNAの塩基番号499から480に相補的なオリゴヌクレオチド

9. *mecA*-RNAの塩基番号551から532に相補的なオリゴヌクレオチド (配列番号6)

10. *mecA*-RNAの塩基番号556から575に相補的なオリゴヌクレオチド (配列番号7)

11. *mecA*-RNAの塩基番号581から600に相補的なオリゴヌクレオチド (配列番号8として記載した配列の5' 端16番目から35番目までのオリゴヌクレオチド)

12. *mecA*-RNAの塩基番号606から625に相補的なオリゴヌクレオチド

13. *mecA*-RNAの塩基番号672から691に相補的なオリゴヌクレオチド (配列番号9)

14. *mecA*-RNAの塩基番号941から961に相補的なオリゴヌクレオチド (配列番号10)

15. *mecA*-RNAの塩基番号967から986に相補的なオリゴヌクレオチド (配列番号11)

16. *mecA*-RNAの塩基番号1134から1153に相補的なオリゴヌクレオチド (配列番号12)

17. *mecA*-RNAの塩基番号1154から1173に相補的なオリゴヌクレオチド (配列番号13)

18. *mecA*-RNAの塩基番号1221から1240に相補的なオリゴヌクレオチド (配列番号14)

19. *mecA*-RNAの塩基番号1656から1675に相補的なオリゴヌクレオチド (配列番号15)

20. *mecA*-RNAの塩基番号1701から1720に相補的なオリゴヌクレオチド (配列番号16)

21. *mecA*-RNAの塩基番号1852から1871に相補的なオリゴヌ

クレオチド

22. mecA-RNAの塩基番号1906から1925に相補的なオリゴヌクレオチド

23. mecA-RNAの塩基番号596から615に相補的なオリゴヌクレオチド（配列番号8として記載した配列の5'端1番目から20番目までのオリゴヌクレオチド）

24. mecA-RNAの塩基番号577から615に相補的なオリゴヌクレオチド（配列番号8）

25. mecA-RNAの塩基番号1087から1100に相補的なオリゴヌクレオチド（配列番号17）

次に、上記の反応液を、41℃で5分間保温後、AMV-RTase（宝酒造（株）製、AMV-RTaseはDNA/RNA二本鎖のRNAを切断する酵素である）を含む溶液を1μl添加し、引き続きPCRチューブを41℃に5分間保温した。

【0022】

反応後の切断断片を確認するため、ポリアクリルアミドゲル（アクリルアミド濃度は5%、尿素7M）電気泳動を実施した。電気泳動後に市販の染色液（商品名；SYBR Green II、宝酒造（株）製）により染色を行った。標的RNAの特定部位にオリゴヌクレオチドが結合すると、AMV-RTaseのリボヌクレースH活性により、DNA/RNA二本鎖のRNAが切断され、特定バンドが観察される。

【0023】

電気泳動結果を図1に示した。各レーンにおいて新たに出現したバンドのうち、用いた1つのオリゴヌクレオチドにより特異的に切断された結果生じた2つのバンドが観察されたレーンについて、長さが短いほうのバンドを矢印で示した。また、非特異的な切断バンドが顕著なものについてそのバンドを丸で囲んで示した。これより、上記オリゴヌクレオチドのうち、配列番号1から17及び配列番号8を含むオリゴヌクレオチド溶液を用いた場合のみ、いずれも顕著な非特異切断バンドの無い、特異的な切断バンドが確認できたため、これらのオリゴヌクレ

オチドはいずれも m e c A - R N A に 4 1 ℃ で強く結合している事が示された。

【 0 0 2 4 】

【発明の効果】

以上の説明のように、本願発明のオリゴヌクレオチドは、RNA が分子内構造を形成し、プライマーやプローブの結合を阻害しかねない、比較的低温かつ一定温度（35～50℃、好ましくは41℃）条件下でも、PBP-2' をコードする m e c A 遺伝子に由来する RNA と相補的に結合するオリゴヌクレオチドである。従って、標的 RNA を熱変性することなく、オリゴヌクレオチドを特異的に結合させることが可能となる。このように本願発明のオリゴヌクレオチドは、M R S A の遺伝子要素である m e c A 遺伝子に由来する RNA を切断、増幅又は検出等するため、すなわち RNA の増幅で使用するオリゴヌクレオチドプライマーやオリゴヌクレオチドプローブとして有用である。

【 0 0 2 5 】

上記以外にも、本願発明のオリゴヌクレオチドは、m e c A 遺伝子を増幅し又は検出等するために有用である。また更には二本鎖 DNA を PCR 法等で増幅したり、RNA を逆転写して得られる c D N A を検出等するためには、上記した具体的なオリゴヌクレオチドと相補的であるオリゴヌクレオチドも有用である。

【 0 0 2 6 】

本願発明のオリゴヌクレオチドは、配列表に記載した塩基配列（20mer）のものに限られず、これら配列中の少なくとも連続した10塩基以上からなるオリゴヌクレオチドであれば良い。これは、比較的低温（好ましくは41℃）条件下で、プライマー又はプローブの標的核酸への特異性を確保するためには10mer 程度の塩基配列があれば十分であることから明らかである。

【 0 0 2 7 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> TOSOH Corporation

<120> メシチリン耐性黄色ブドウ球菌検出のためのオリゴヌクレオチド

<130> PA211-0187

<160> 17

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> m e c A 又は該遺伝子に由来する R N A と特異的に結合可能であるオリゴ
ヌクレオチド

<400> 1

ttttttatttt tacgatacctg

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> m e c A 又は該遺伝子に由来する R N A と特異的に結合可能であるオリゴ
ヌクレオチド

<400> 2

ctcgtttttt atttttagat

20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> m e c A 又は該遺伝子に由来する R N A と特異的に結合可能であるオリゴヌクレオチド

<400> 3

gtagtttggtt ttaattttat

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> m e c A 又は該遺伝子に由来する R N A と特異的に結合可能であるオリゴヌクレオチド

<400> 4

cacataccat cttctttaac

20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> m e c A 又は該遺伝子に由来する R N A と特異的に結合可能であるオリゴヌクレオチド

<400> 5

tgtttcgggc taaaatttta

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> m e c A 又は該遺伝子に由来する R N A と特異的に結合可能であるオリゴヌクレオチド

<400> 6

ttataatctt ttttagatac

20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> m e c A 又は該遺伝子に由来する R N A と特異的に結合可能であるオリゴヌクレオチド

<400> 7

atacttagtt ctttagcgat

20

<210> 8

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> m e c A 又は該遺伝子に由来する R N A と特異的に結合可能であるオリゴヌクレオチド

<400> 8

cccaattttg atccatttgt tgttgatata gtcttcaga

39

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> m e c A 又は該遺伝子に由来する R N A と特異的に結合可能であるオリゴヌクレオチド

<400> 9

atTTTTTTgc gaaatcactt

20

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> m e c A 又は該遺伝子に由来する R N A と特異的に結合可能であるオリゴ
ヌクレオチド

<400> 10

21

ttttcttttt ctctattaat g

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> m e c A 又は該遺伝子に由来する R N A と特異的に結合可能であるオリゴ
ヌクレオチド

<400> 11

20

gttagttgaa tatctttgcc

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> m e c A 又は該遺伝子に由来する R N A と特異的に結合可能であるオリゴヌクレオチド

<400> 12

atttattata ttcttcgtta

20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> m e c A 又は該遺伝子に由来する R N A と特異的に結合可能であるオリゴヌクレオチド

<400> 13

ttcttttttta tcttcggtta

20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> m e c A 又は該遺伝子に由来する R N A と特異的に結合可能であるオリゴヌクレオチド

<400> 14

tcattgctgt taatattttt

20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> m e c A 又は該遺伝子に由来する R N A と特異的に結合可能であるオリゴヌクレオチド

<400> 15

ctttgttttt cgtgtctttt

20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> m e c A 又は該遺伝子に由来する R N A と特異的に結合可能であるオリゴヌクレオチド

<400> 16

ttaatagatt gatattttct

20

<210> 17

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mecA又は該遺伝子に由来するRNAと特異的に結合可能であるオリゴヌクレオチド

<400> 17

gaagggtgtgc ttac

14

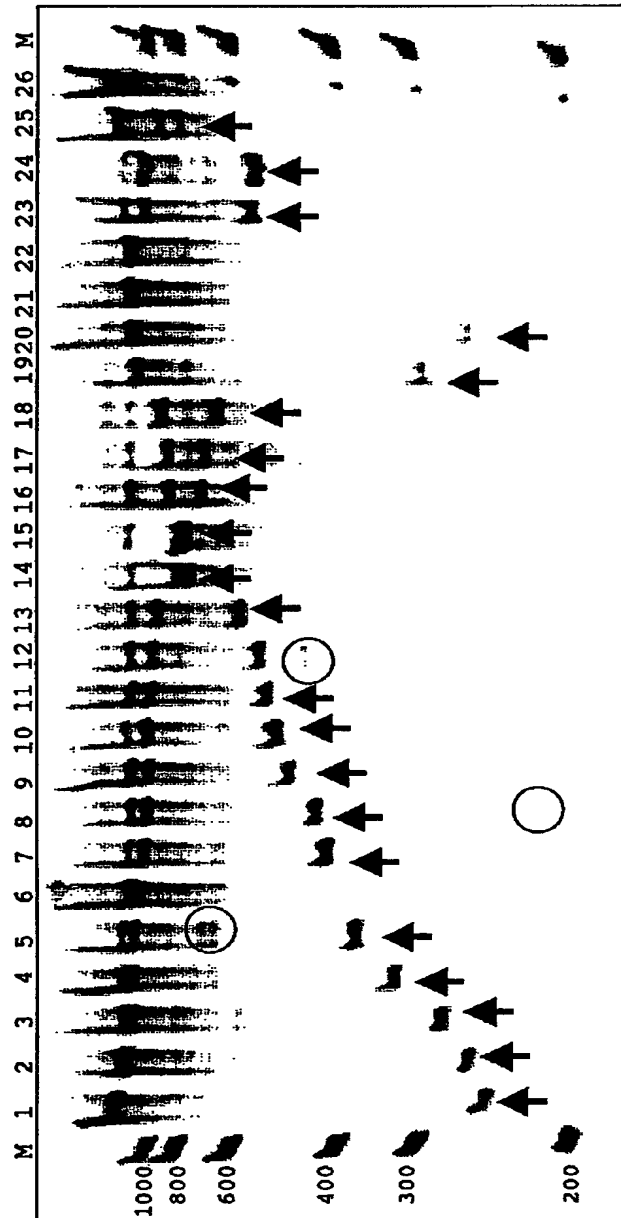
【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、オリゴヌクレオチドの状態を示すための写真（白黒反転）であり、PBP-2'をコードするmecA-RNAの分子内構造フリー領域に対し設計したオリゴヌクレオチドを用いて、41℃でのmecA-RNAへの結合実験を行った後のサンプルの7M尿素-5%ポリアクリルアミドゲルの電気泳動写真である。図中、レーンMはRNAマーカー、レーン1からレーン25は、実施例1で示したオリゴヌクレオチド溶液の番号であり、レーン26はオリゴヌクレオチドを用いなかった場合である。

【書類名】 図面

【図1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 MRSAが産生する細胞壁合成タンパク質PBP-2' をコードするmecA遺伝子又はこれら遺伝子に由来するRNAを特異的に切断したり、増幅したり、これらの検出及び同定を高感度で行うために有用なオリゴヌクレオチドを提供すること。

【解決手段】 MRSAのmecA遺伝子又は該遺伝子に由来するRNAを、切断、検出又は増幅するために有用なオリゴヌクレオチドであって、mecA遺伝子又は該遺伝子に由来するRNAと特異的に結合可能である、配列番号1から17に示したいずれかの配列中の少なくとも連続した10塩基以上からなるオリゴヌクレオチド又はそれらのオリゴヌクレオチドと相補的であるオリゴヌクレオチド。

【選択図】 図1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 0 0 3 3 0 0]

1. 変更年月日	1 9 9 0 年 1 2 月 2 日
[変更理由]	住所変更
住 所	山口県新南陽市開成町 4 5 6 0 番地
氏 名	東ソー株式会社